

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/55, 15/63, C12P 17/04, C12N 9/18, 1/21, C07D 307/04 // (C12N 15/55, C12R 1:77) (C12N 15/63, C12R 1:77) (C12N 9/18, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)		A1	(11) 国際公開番号 WO97/10341 (43) 国際公開日 1997年3月20日(20.03.97)
(21) 国際出願番号	PCT/JP96/02620		
(22) 国際出願日	1996年9月13日(13.09.96)		
(30) 優先権データ 特願平7/259451	1995年9月13日(13.09.95)	JP	(74) 代理人 弁理士 水野昭宣(MIZUNO, Akinobu) 〒150 東京都渋谷区渋谷1丁目10番7号 グローリア宮益坂Ⅲ 305 Tokyo, (JP)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 富士薬品工業株式会社 (FUJI YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒933 富山県高岡市長慶寺530番地 Toyama, (JP)			(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 坂本恵司(SAKAMOTO, Keiji)[JP/JP] 〒933 富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内 Toyama, (JP) 山田秀明(YAMADA, Hideaki)[JP/JP] 〒606 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1 Kyoto, (JP) 清水 昌(SHIMIZU, Sakayu)[JP/JP] 〒604 京都府京都市中京区西ノ京伯楽町14 Kyoto, (JP)			添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: D-PANTOLACTONE HYDROLASE AND GENE ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称 D-パントラクトン加水分解酵素およびそれをコードする遺伝子

(57) Abstract

A novel enzyme which is useful in the optical resolution of D,L-pantolactone via D-selective asymmetric hydrolysis and a gene encoding the same. The invention discloses a gene encoding a natural D-pantolactone hydrolase (for example, one originating in *Fusarium oxysporum*) or a protein having substantially the same activity as the same, host cells transformed by a DNA containing a base sequence encoding the above-mentioned protein; a process for producing the protein with the use of the host cells, and uses of the protein and the host cells.

(57) 要約

D. L-パントラクトンのD-選択的不斉加水分解による光学分割に有用な新規な酵素およびそれをコードする遺伝子を提供する。天然のD-パントラクトン加水分解酵素、例えば、フサリウム・オキシスポルム(*Fusarium oxysporum*)由来の天然のD-パントラクトン加水分解酵素またはそれと実質的に同等な活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を明らかにし、該タンパク質をコードする塩基配列を含有するDNAで形質転換せしめた宿主細胞、該宿主細胞を用いる該タンパク質の製造方法、さらにはそれらタンパク質および宿主細胞の用途。

情報としての用途のみ			
PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード			
AL アルバニア	EE エストニア	LR リベリア	RU ロシア連邦
AM アルメニア	ES スペイン	LS レソト	SDE スーダン
AT オーストリア	FI フィンランド	LT リトアニア	SEG スウェーデン
AU オーストラリア	FR フランス	LU ルクセンブルグ	SSEI シンガポール
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LV ラトヴィア	SSK スロヴェニア
BB バルバドス	GB イギリス	MC モナコ	SSNZ スロヴァキア共和国
BE ベルギー	GE グルジア	MD モルドバ	STG セネガル
BF ブルガリア・ファソ	GH ガーナ	MG マダガスカル	SGZ スウェーデン
BG ブルガリア	GN ギニア	MK マケドニア旧ユーゴスラ	TDG チャーチード
BJ ベナン	GR ギリシャ	VI ヴィア共和国	TJ トーゴ
BR ブラジル	HU ハンガリー	ML マリ	TM タジキスタン
BY ベラルーシ	IE アイルランド	MN モンゴル	TR トルコ
CA カナダ	IS アイスランド	MR モーリタニア	TRT トリニダード・トバゴ
CF 中央アフリカ共和国	IT イタリー	MW マラウイ	TAG ウクライナ
CG コンゴー	JP 日本	MX メキシコ	UAG ウガンダ
CH スイス	KE ケニア	NE ニジェール	USS 米国
CI コート・ジボアール	KG キルギスタン	NL オランダ	UZ ベキスタン共和国
CM カメルーン	KP 朝鮮民主主義人民共和国	NO ノルウェー	VN ヴィエトナム
CN 中国	KR 大韓民国	NZ ニュージーランド	YU ユーゴスラビア
CZ チェコ共和国	KZ カザフスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	LI リヒテンシュタイン	PT ポルトガル	
DK デンマーク	LK スリランカ	RO ルーマニア	

明 細 書

D-パントラクトン加水分解酵素およびそれをコードする遺伝子

技術分野

本発明はD, L-パントラクトンのD-選択的不斉加水分解による光学分割に有用な新規な酵素およびそれをコードする遺伝子に関するものである。特に本発明は、フサリウム・オキシスポルム (Fusarium oxysporum) 由来の天然のD-パントラクトン加水分解酵素またはそれと実質的に同等な活性を有するタンパク質およびそれをコードする遺伝子に関するものであり、さらに詳しくは、本発明は該タンパク質をコードする塩基配列を含有するDNA, 該DNAで形質転換せしめた宿主細胞、該宿主細胞を用いる該D-パントラクトン加水分解酵素の製造方法、さらにはそれらタンパク質および宿主細胞の用途に関するものである。

背景技術

D-パントラクトンは医学上または生理学上重要なビタミンとして有用なD-パントテン酸やパンテチンの製造における中間体として知られている。従来、D-パントラクトンは化学的に合成されたD, L-パントラクトンを光学分割することにより製造されている。しかしながら、この方法は、キニーネ、ブルシン等の高価な分割剤を必要とするものであり、D-パントラクトンの回収も容易でない等の欠点を有している。このような問題点を解決するため本発明者らはD, L-パントラクトンの酵素的不斉加水分解による光学分割法を特開平3-65198号および特開平4-144681号各公報に提示した。

すなわち、フサリウム属、シリンドロカルボン属、ジベレラ属、アス

ペルジラス属、ペニシリウム属、リゾプス属、ボルテラ属、グリオクラ
ディウム属、ユーロティウム属、ネクトリア属、シゾフィラム属、ミロ
セシウム属、ノイロスボラ属、アクリモニウム属、ツベルクリナ属、ア
ブシジア属、スポロスリクス属、バーティシリウム属またはアルスロダ
5 ラマ属に属する微生物より選ばれたラクトン加水分解能を有する微生物
を用いてD、L-パントラクトン中のD-体を選択的に不斉加水分解せ
しめることにより、D-パントイン酸を生成せしめ、そのD-パントイ
ン酸を分離し、D-パントラクトンに変換することを特徴とするD-パ
ントラクトンの製造法および上記した属に属する微生物によるD-パン
10 トラクトン加水分解酵素の製造法である。

しかし、これらの開示されている微生物の多くが直ちに工業的に利用
可能なほどの加水分解活性を有しているとは必ずしもいえず、当該微生物
がもつ酵素活性を工業可能なレベルまでに上昇させるためには、培養
条件や活性誘導条件等について長時間をする煩雑で難しい検討が必要
15 とされる。またこれらの当該微生物は真菌であるため、菌体が様々な形
態をもつ菌糸状を呈し、単一な形態を有する細菌などに比べ、工業的生
産に有利な固定化菌体の調製がかなり難しいという問題がある。さらに
酵素を菌体から精製する際にも、D-パントラクトン加水分解酵素に關
してはかなり回収率が悪いなどの問題がある。

20 発明の開示

本発明はこれらの問題点を解決し、さらにD-パントラクトン加水分
解酵素そのものの改変により酵素活性の飛躍的な上昇を可能ならしめる
ことを目的とする。すなわち、本発明は天然のD-パントラクトン加水
分解酵素、例えば、フサリウム・オキシスポルム由来の天然のD-パン
25 トラクトン加水分解酵素またはそれと実質的に同等な活性を有するタン

パク質をコードする遺伝子を明らかにし、該タンパク質をコードする塩基配列を含有するDNAで形質転換せしめた宿主細胞、該宿主細胞を用いる該タンパク質の製造方法、さらにはそれらタンパク質および宿主細胞の用途等を提供することにある。

5 本発明者らは、上記ラクトン加水分解能を有する微生物からD-パン
トラクトン加水分解酵素をコードする遺伝子を単離し、こうして単離し
たD-パントラクトン加水分解酵素遺伝子を利用して、効率よく且つよ
り生産性に優れたD-パントラクトン生産システムを開発すれば、上記
10 様々な問題点が解決できるだけでなく、更にはより新しい機能をも併せ
持つラクトン加水分解能をもつところの酵素の開発及びそれを使用した
技術の開発にも資するところが多いと考え、特にはD-パントラクトン
加水分解酵素を產生するフサリウム属微生物、例えば、フサリウム・オ
キシスポルムからそれ由来のD-パントラクトン加水分解活性を有する
15 加水分解酵素をコードする新規な遺伝子を単離することに成功し、本發
明を完成させるに至った。

本発明は、天然のD-パントラクトン加水分解酵素またはそれと実質
的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次コンフォメー
ションを持つタンパク質またはその塩、そのタンパク質の特徴的な部分
ペプチドまたはその塩、それらをコードする遺伝子、例えばDNA、R
20 NAなど、その遺伝子を遺伝子組換え技術で操作することが可能なよう
に含有しているベクターあるいはプラスミド、こうしたベクターなどで
形質転換された宿主細胞、その宿主細胞を、培養して該タンパク質または
その塩などを製造する方法、さらにこうして遺伝子操作された宿主細
胞や組換えタンパク質またはその塩などを用いて、D、L-パントラク
25 トンの光学分割を行いD-パントラクトンを合成する方法及び固定化酵

素などといったD-ペントラクトン生産システム手段に関する。

好ましくは、本発明では、配列表の配列番号：1で表されるアミノ酸配列またはそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有することを特徴とするD-ペントラクトン加水分解酵素またはその塩が挙げられる。

5 特に本発明は、

(1) 天然のD-ペントラクトン加水分解酵素またはそれと実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次コンフォメーションを持つものであることを特徴とするタンパク質またはその塩、

10 (2) 該天然のD-ペントラクトン加水分解酵素がフサリウム属、シリンドロカルポン属、ジベレラ属、アスペルジラス属、ベニシリウム属、リゾプス属、ボルテラ属、グリオクラディウム属、ユーロティウム属、ネクトリア属、シゾフィラム属、ミロセシウム属、ノイロスボラ属、アクリモニウム属、ツベルクリナ属、アブシジア属、スポロスリクス属、バーティシリウム属またはアルスロダーマ属に属する微生物由来のもの
15 であることを特徴とする上記第(1)項記載のタンパク質、

(3) 該天然のD-ペントラクトン加水分解酵素がフサリウム属由来のものであることを特徴とする上記第(1)項記載のタンパク質、

20 (4) 配列表の配列番号：1で表されるアミノ酸配列またはそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有するD-ペントラクトン加水分解酵素またはその塩であることを特徴とする上記第(1)～(3)項のいずれか一記載のタンパク質、

(5) 外因性DNA配列を原核生物において発現して得たものであることを特徴とする上記第(1)～(4)項のいずれか一記載のタンパク質、

25 (6) 配列表の配列番号：1で表されるアミノ酸配列またはそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有することを特徴とする上記第(1)～(5)項のいずれか一記載のタンパク質、

(7) 上記第(1)～(6)項のいずれか一記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(8) 上記第(1)～(7)項のいずれか一記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とする核酸、

5 (9) 配列表の配列番号：2で表される塩基配列のうちオープン・リーディング・フレーム部分またはそれと実質的に同等な活性を有する塩基配列を有することを特徴とする上記第(8)項記載の核酸、

(10) 上記第(8)又は(9)項記載の核酸を含有することを特徴とするベクター、

10 (11) 上記第(10)項記載のベクターを保有することを特徴とする形質転換体、

(12) 上記第(11)項記載の形質転換体を増殖可能な栄養培地中で培養し、組換えタンパク質としてD-パントラクトン加水分解酵素またはその塩を包含する上記第(1)～(7)項のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドを生成せしめることを特徴とするD-パントラクトン加水分解酵素またはその塩を包含する上記第(1)～(7)項のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドの製造方法、及び

15 (13) 上記第(1)～(7)項のいずれか一記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたは上記第(11)項記載の形質転換体を用いてのD、L-パントラクトンの光学分割によるD-パントラクトンの製造法を提供する。

より具体的には、本発明は配列表の配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有することを特徴とするD-パントラクトン加水分解酵素またはその塩を提供する。

図面の簡単な説明

第1図は、D-ペントラクトン加水分解酵素の消化ペプチドの解析により得られたアミノ酸配列を示す。

5 第2図は、D-ペントラクトン加水分解酵素の消化ペプチドのcDNAアミノ酸配列に対応する部位を示す。

第3図は、D-ペントラクトン加水分解酵素のゲノムDNAを鋳型としたPCRに用いたプライマー構造を示す。

第4図は、D-ペントラクトン加水分解酵素発現ベクター構築に用いたPCRに使用したプライマーの構造を示す。

10 第5図は、D-ペントラクトン加水分解酵素のアミノ酸配列とそれをコードする塩基配列を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明では、天然のD-ペントラクトン加水分解酵素、例えば、フサリウム・オキシスポルム由来の天然のD-ペントラクトン加水分解酵素またはそれと実質的に同等な活性を有するタンパク質をコードする遺伝子のクローニング、同定、そして特徴的な配列の決定（シークエンシング）、該遺伝子の発現ベクターへの組換えなどの操作、該タンパク質をコードする塩基配列を含有するDNAを用いての形質転換せしめた宿主細胞の作成及び培養・増殖、該宿主細胞を用いる該タンパク質の製造、
15 さらにはそれらタンパク質および宿主細胞の用途等が提供され、それらは以下順次詳しく解説される。また本発明では上記D-ペントラクトン加水分解酵素をコードする遺伝子を利用する各種の手段が提供され、さらにこうして単離したD-ペントラクトン加水分解酵素遺伝子を利用して、効率よく且つより生産性に優れたD-ペントラクトン生産システム
20 が提供される。

本発明では、天然のD-パントラクトン加水分解酵素またはそれと実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次コンフォメーションを持つタンパク質またはその塩、そのタンパク質の特徴的な部分ペプチドまたはその塩、それらをコードする遺伝子、例えばDNA、RNAなど、その遺伝子を遺伝子組換え技術で操作することが可能なよううに含有しているベクターあるいはプラスミド、こうしたベクターなどで形質転換された宿主細胞、その宿主細胞を、培養して該タンパク質またはその塩などを製造する方法、さらにこうして遺伝子操作された宿主細胞や組換えタンパク質またはその塩などを用いて、D、L-パントラクトンの光学分割を行いD-パントラクトンを合成する方法及び固定化酵素などといったD-パントラクトン生産システム手段が提供されている。

本発明では、好ましくは、配列表の配列番号：1で表されるアミノ酸配列あるいはそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有することを特徴とするD-パントラクトン加水分解酵素またはその塩が具体的に説明されているが、本発明のD-パントラクトン加水分解酵素としては、D-パントラクトン加水分解能をもつ新規なアミノ酸配列を有するものであればよい。D-パントラクトン加水分解能としてはその活性が同質のものであればよい。より好ましくは本発明のD-パントラクトン加水分解酵素は、配列表の配列番号：1で表されるアミノ酸配列またはそれと実質的に同等及び／又は同一のアミノ酸配列を有するものがすべて挙げられる。

本発明のD-パントラクトン加水分解酵素遺伝子は、例えば次の方法でクローニングできる。なお、遺伝子組換え技術は、例えばT. Maniatis et al., "Molecular Cloning", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) :

日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法ⅠⅠ」、東京化学同人(1986)；日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸ⅠⅢ(組換えDNA技術)」、東京化学同人(1992)；R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68, Academic Press, New York (1980)；R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 & 101, Academic Press, New York (1983)；R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153, 154 & 155, Academic Press, New York (1987)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。それらの手法は、本発明の目的に合わせて公知の手法に独自の改変改良を加えたものであることもできる。

1) D-バントラクトン加水分解酵素の部分ゲノムDNAのクローニング

培養し、得られたフサリウム・オキシスピルムの菌体を破碎し、常法により染色体DNAを遠心分離後、RNAを分解除去し、除タンパク操作をおこなって、DNA成分を精製する。これらの操作については「植物バイオテクノロジー実験マニュアル：農村文化社、252頁」を参考されたい。またフサリウム属に属するD-バントラクトン加水分解酵素産生能をもつ微生物であれば、DNA源として好適に用いることが出来る。フサリウム属微生物としては、例えば、フサリウム・オキシスピルム IFO 5942、フサリウム・セミテクタム IFO 30200などを用いることが出来る。

同様にシリンドロカルポン属、ジベレラ属、アスペルジラス属、ベニシリウム属、リゾプス属、ボルテラ属、グリオクラディウム属、ユーロティウム属、ネクトリア属、シゾフィラム属、ミロセシウム属、ノイロ

スボラ属、アクリモニウム属、ツベルクリナ属、アブシジア属、スボロ
スリクス属、バーティシリウム属またはアルスロダーマ属に属する微生物
であり、D-パントラクトン加水分解酵素産生能をもつ微生物もD-
A源として用いることが出来よう。こうした微生物としては、例えば、
5 シリンドロカルボン・トンキネンス IFO 30561、ジベレラ・
フジクロイ IFO 6349、アスペルジラス・アワモリ IFO
4033、ペニシリウム クリソゲナム IFO 4626、リゾプス・
オリザエ IFO 4706、ボルテラ・ブクシ IFO 6003、
グリオクラディウム・カテヌラタム IFO 6121、ユーロティウ
ム・シェバリエリ IFO 4334、ネクトリア・エレガンス
10 IFO 7187、シゾフィラム・コムネ IFO 4928、ミロセ
シウム・ロリダム IFO 9531、ノイロスボラ・クラツサ
IFO 6067、アクリモニウム・フシディオイデス IFO
6813、ツベルクリナ・ペルシシナ IFO 6464、アブシジア・
リヒセイミ IFO 4009、スボロスリクス・シェンキ IFO
15 5983、バーティシリウム・マルトウセイ IFO 6624または
アルスロダーマ・ウンシナトウム IFO 7865などが挙げられる
ここで「IFO」は財団法人醣酵研究所〔(郵便番号532)大阪市
淀川区十三本町二丁目17番85号〕を示し、そこに記載の番号は
20 財団法人醣酵研究所のカタログ番号を示すものである。

2) プローブの作製

D-パントラクトン加水分解酵素の内部ペプチドのアミノ酸情報に基
づいて合成オリゴヌクレオチドプライマーを作製する。例えば、上記微
生物であり、D-パントラクトン加水分解酵素産生能をもつ微生物から
25 得られた精製D-パントラクトン加水分解酵素の内部ペプチドのアミノ

酸情報に基づいて合成オリゴヌクレオチドプライマーを作製することができる。典型的な場合、アミノ酸配列を基に、デジェネレイティッド・プライマーなどを作製する。プライマーの作製は、当該分野で知られた方法で行うことができ、例えばDNA自動合成装置を用い、フォスフォジエステル法、フォスフォトリエステル法、フォスフォアミダイト法などにより合成できる。具体的にはフサリウム・オキシスポルム IFO 5-942を栄養培地中に培養して得られた菌体からD-ペントラクトン加水分解酵素を精製し、必要に応じペプチド加水分解酵素などで断片化し、その酵素の内部ペプチドのアミノ酸配列の情報を収集する。こうして得られたアミノ酸配列の情報より好ましい合成オリゴヌクレオチドプライマーを作製する。このプライマーを用い、D-ペントラクトン加水分解酵素のゲノムDNAを鑄型にしてPCRをおこなう。PCR反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えばR. Saiki, et al., Science, Vol. 230, 10 pp. 1350 (1985); R. Saiki, et al., Science, Vol. 239, pp. 487 (1988); Henry A. Erlich, PCR Technology, Stockton Press などに記載された方法に従って行うことができる。反応は、例えば、市販のキットや試薬を利用して行うことが出来る。

得られた增幅DNA断片をシークエンスし、精製酵素の内部ペプチドのアミノ酸配列と相同的な配列を含むことを確認し、それをアイソトープで標識しプローブとしてその後の実験などに使用する。塩基配列の決定は、ダイデオキシ法、例えばM13ダイデオキシ法など、Maxam-Gilbert法などを用いて行うことができるが、市販のシークエンシングキット、例えばTaqダイプライマーサイクルシークエンシングキットなどを用いたり、自動塩基配列決定装置、例えば蛍光DNAシーケンサー装置などを用いて行うことが出来る。プローブなどを放射性同位体などによって

標識するには、市販の標識キット、例えばランダムプライムdDNAラベリングキット(Boehringer Mannheim)などを使用して行うことが出来る。

3) D-ペントラクトン加水分解酵素 c DNAのクローニング

5 a) mRNAの調製およびcDNAライブラリーの作製

培養し、得られたフサリウム・オキシスポルムの菌体を破碎し、AGPC法に従って全RNAを抽出し、ここから適当な方法、例えばオリゴdTセルロースカラムを用いてmRNAを精製する。典型的にはmRNAの単離は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、T. Maniatis et al., "Molecular Cloning", 2nd Ed., Chapter 7, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); L. Grossman et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 12, Part A & B, Academic Press, New York (1968); S. L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p. 33 & p. 215, Academic Press, New York (1987); Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979などに記載の方法、例えばグアニジン-塩化セシウム法、チオシアン酸グアニジン法、フェノール法などの方法で行うことが出来る。必要に応じ、得られた全RNAはオリゴ(dT)-セルロースカラムなどを使用して精製してポリ(A) mRNAを得ることが出来る。またフサリウム属に属するD-ペントラクトン加水分解酵素產生能をもつ微生物であれば、mRNA源として好適に用いることが出来る。フサリウム属微生物としては、例えば、フサリウム・オキシスポルム IFO 5942、フサリウム・セミテクタム IFO 30200などを用いることが出来る。

25 同様にシリンドロカルボン属、ジベレラ属、アスペルジラス属、ペニ

シリウム属、リゾプス属、ボルテラ属、グリオクラディウム属、ユーロティウム属、ネクトリア属、シゾフィラム属、ミロセシウム属、ノイロスボラ属、アクリモニウム属、ツベルクリナ属、アブシジア属、スボロスリクス属、バーティシリウム属またはアルスロダーマ属に属する微生物であり、D-バントラクトン加水分解酵素産生能をもつ微生物もmRNA源として用いることが出来よう。こうした微生物としては、例えば、シリンドロカルボン・トンキネンス IFO 30561、ジベレラ・フジクロイ IFO 6349、アスペルジラス・アワモリ IFO 4033、ペニシリウム クリソゲナム IFO 4626、リゾプス・オリザエ IFO 4706、ボルテラ・ブクシ IFO 6003、グリオクラディウム・カヌラタム IFO 6121、ユーロティウム・シエバリエリ IFO 4334、ネクトリア・エレガンス IFO 7187、シゾフィラム・コムネ IFO 4928、ミロセシウム・ロリダム IFO 9531、ノイロスボラ・クラツサ IFO 6067、アクリモニウム・フシディオイデス IFO 6813、ツベルクリナ・ペルシシナ IFO 6464、アブシジア・リヒセイミ IFO 4009、スボロスリクス・シエンキ IFO 5983、バーティシリウム・マルトウセイ IFO 6624またはアルスロダーマ・ウンシナトウム IFO 7865などが挙げられる。

得られたmRNAを鋳型として逆転写酵素（リバース・トランスクリプターゼ）などを用いてcDNAを合成する。mRNA及び逆転写酵素を用いてのcDNA合成は当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、H. Land et al., "Nucleic Acids Res.", Vol. 9, 2251 (1981); U. Gubler et al., "Gene", Vol. 25, 263-269 (1983); S. L. Berger et al. ed.,

“Methods in Enzymology”, Vol. 152, p.307, Academic Press, New York (1987) などに記載の方法が挙げられる。こうして得られた c DNA はこれを市販のファージベクターに挿入し、さらに常法によりパッケージングする。こうして作製された c DNA を基に c DNA ライ

5 ブラリーを構築できる。

b) D-パントラクトン加水分解酵素 c DNA のクローニング

宿主細胞に上記パッケージングした c DNA ライブラリーを感染させ、

10 プラークハイブリダイゼーションによりポジティブ・プラークを得る。

得られたクローンをシークエンスし、アミノ酸配列を検討することによ

り、D-パントラクトン加水分解酵素遺伝子がクローニングされること

が確認できる。またファージベクターを使用する以外で、大腸菌などの

宿主細胞の形質転換をするには、例えばカルシウム法、ルビジウム／

カルシウム法など当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様

な方法で行うことができる (D. Hanahan, J. Mol. Biol., Vol. 166,

15 p. 557 (1983)など)。

作製された c DNA を鋳型に PCR 増幅反応を行うこともできる。典型的な場合、上記 2) で得られたプライマーを使用することが出来る。

D-パントラクトン加水分解酵素遺伝子を組込むプラスミドとしては

20 遺伝子工学的に常用される宿主細胞（例えば、大腸菌、枯草菌等の原核

細胞宿主、酵母、等の真核細胞宿主）中で該 DNA が発現できるプラス

ミドであればどのようなプラスミドでもよい。こうした配列内には、例

えば選択した宿主細胞で発現するのに好適なコドンを導入することや、

制限酵素部位を設けることも可能である。また、目的とする遺伝子の発

現を容易にするための制御配列、促進配列など、目的とする遺伝子を結

合するのに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生物質耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに有用な配列等を含ませることが可能である。

好ましくは、適當なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファン (t r p) プロモーター、ラクトース (l a c) プロモーター、トリプトファン・ラクトース (t a c) プロモーター、リポプロテイン (l p p) プロモーター、 λ ファージPLプロモーター等を、酵母を宿主とするプラスミドでは、G A L 1 、G A L 1 0 プロモーター等を使用し得る。

大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えば p B R 3 2 2 、p U C 1 8 、p U C 1 9 、p U C 1 1 8 、p U C 1 1 9 、p S P 6 4 、p S P 6 5 、p T Z - 1 8 R / - 1 8 U 、p T Z - 1 9 R / - 1 9 U 、p G E M - 3 、p G E M - 4 、p G E M - 3 Z 、p G E M - 4 Z 、p G E M - 5 Z f (-) 、p B l u e s c r i p t K STM (Stratagene) などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、p A S 、p K K 2 2 3 (Pharmacia) 、p M C 1 4 0 3 、p M C 9 3 1 、p K C 3 0 なども挙げられる。酵母を宿主とするプラスミドとしては、Y I p 型ベクター、Y E p 型ベクター、Y R p 型ベクター、Y C p 型ベクターなどが挙げられ、例えば p G P D - 2 などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌 K 1 2 株に由来するものが挙げられ、例えば N M 5 3 3 X L 1 - B l u e 、C 6 0 0 、D H 1 、H B 1 0 1 、J M 1 0 9 などが挙げられる。

本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、D N A 断片をクローニングするのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるD N A 修

飾・分解酵素、DNAポリメラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNAリガーゼなどを用いることが出来る。制限酵素としては、例えば、R. J. Roberts, Nucleic Acids Res. Vol. 13, r165 (1985); S. Linn et al. ed. Nucleases, p. 109, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1982などに記載のものが挙げられる。

逆転写酵素としては、例えばマウスモロネイ白血病ウイルス (mouse Moloney leukemia virus; MMLV) 由来の逆転写酵素 (reverse transcriptase)、ニワトリ骨髄芽球症ウイルス (avian myeloblastosis virus; AMV) 由来の逆転写酵素などが挙げられ、特にはRNase H 欠損体などは好ましく用いることが出来る。DNAポリメラーゼとしては、例えば大腸菌DNAポリメラーゼ、その誘導体であるクレノウ・フラグメント、大腸菌ファージT 4 DNAポリメラーゼ、大腸菌ファージT 7 DNAポリメラーゼ、耐熱菌DNAポリメラーゼなどが挙げられる。

末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼとしては、例えばR. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 96, Academic Press, New York (1983) に記載の3' - OH末端にデオキシヌクレオチド(dNMP)を付加するTdTaseなどが挙げられる。DNA修飾・分解酵素としては、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼなどが挙げられ、例えばヘビ毒ホスホジエステラーゼ、脾臓ホスホジエステラーゼ、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼI、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼI I I、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼV I I、λエキソヌクレアーゼ、DNase I、ヌクレアーゼS 1、ミクロコッカス (Micrococcus) ヌクレアーゼなどが挙げられる。DNAリガーゼとしては、例えば大腸菌DNAリガーゼ、T 4 DNAリガーゼなどが挙げられる。

DNA遺伝子をクローニングしてDNAライブラリーを構築するのに適したベクターとしては、プラスミド、λファージ、コスミド、P1

ファージ、F因子、YACなどが挙げられ、好ましくは λ ファージ由来のベクターが挙げられ、例えばCharon 4A、Charon 21A、 λ gt10、 λ gt11、 λ DASHII、 λ FIXII、 λ EMBL3、 λ ZAPIITM (Stratagene) などが挙げられる。

5 さらに、本発明に係わるD-パントラクトン加水分解酵素の遺伝子塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、D-パントラクトン加水分解酵素のアミノ酸配列中に適宜、1個ないし複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加したごとき変異を導入した相当するタンパク質を製造することができる。こうした変異・変換・修飾法としては、日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法ⅠⅠ」、p105 (広瀬進)、東京化学同人 (1986) ; 日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸ⅠⅢ (組換えDNA技術)」、p233 (広瀬進)、東京化学同人 (1992) ; R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, p. 350 & p. 367, Academic Press, New York (1987) ; R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983) ; J. A. Wells et al., "Gene", Vol. 34, p. 315 (1985) ; T. Grundstroem et al., "Nucleic Acids Res.", Vol. 13, p. 3305 (1985) ; J. Taylor et al., "Nucleic Acids Res.", Vol. 13, p. 8765 (1985) ; R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York (1987) ; A. R. Oliphant et al., "Gene", Vol. 44, p. 177 (1986) などに記載の方法が挙げられる。例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法 (部位特異的変異導入法) 、Kunkel法、dNTP[α S]法 (Eckstein) 法、亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の

方法が挙げられる。

さらに得られた本発明のタンパク質は、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、プロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなど酵素などを用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などにすることができる。また遺伝子組換え法で製造する時に融合タンパク質として発現させ、生体内あるいは生体外で天然のD-ペントラクトン加水分解酵素と実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合タンパク質はその融合部を利用してアフィニティクロマトグラフィーなどで精製することも可能である。タンパク質の構造の修飾・改変などは、例えば日本生化学会編、「新生化学実験講座1、タンパク質VII、タンパク質工学」、東京化学同人(1993)を参考にし、そこに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法、さらにはそれらと実質的に同様な方法で行うことができる。

かくして本発明は、1個以上のアミノ酸残基が同一性の点で天然のものと異なるもの、1個以上のアミノ酸残基の位置が天然のものと異なるものであってもよい。本発明は、天然のD-ペントラクトン加水分解酵素に特有なアミノ酸残基が1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など)欠けている欠失類縁体、特有のアミノ酸残基の1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さらに好ましくは1~20個、特には1~10個など)が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上(例えば、1~80個、好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~40個、さ

らに好ましくは1～20個、特に1～10個など)のアミノ酸残基が付加されている付加類縁体も包含する。天然のD-パントラクトン加水分解酵素の特徴であるドメイン構造を有しているものも包含されてよい。また、同質のD-パントラクトン加水分解酵素活性を有するものも挙げられる。

天然のD-パントラクトン加水分解酵素の特徴であるドメイン構造が維持されていれば、上記のごとき変異体は、全て本発明に包含される。また本発明の天然のD-パントラクトン加水分解酵素と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然のD-パントラクトン加水分解酵素と実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに天然に生ずる変異体の一つであることもできる。こうした本発明のD-パントラクトン加水分解酵素は、下記で説明するように分離・精製処理ができる。一方では、こうして本発明は上記したポリペプチドをコードするDNA配列、そして天然の特性の全部あるいは一部を有するD-パントラクトン加水分解酵素のポリペプチド、さらにその類縁体あるいは誘導体をコードするDNA配列も包含する。該D-パントラクトン加水分解酵素の塩基配列は、修飾(例えば、付加、除去、置換など)されることもでき、そうした修飾されたものも含まれてよい。

本発明のDNA配列は、これまで知られていなかったD-パントラクトン加水分解酵素タンパク質のアミノ酸配列に関する情報を提供しているから、こうした情報を利用することも本発明に包含される。こうした利用としては、例えばD-パントラクトン加水分解酵素及び関連タンパク質をコードする微生物、特に好ましくはD-パントラクトン加水分解

酵素産生能をもつ微生物、例えば、フサリウム属、シリンドロカルポン属、ジベレラ属、アスペルジラス属、ペニシリウム属、リゾpus属、ボルテラ属、グリオクラディウム属、ユーロティウム属、ネクトリア属、シゾフィラム属、ミロセシウム属、ノイロスボラ属、アクリモニウム属、ツベルクリナ属、アブシジア属、スプロスリクス属、バーティシリウム属またはアルスロダーマ属に属する微生物であり、D-パントラクトン加水分解酵素産生能をもつ微生物の、ゲノムDNA及びcDNAの単離及び検知のためのプローブの設計などが挙げられる。

本発明のDNA配列は、例えばD-パントラクトン加水分解酵素及び関連タンパク質をコードするD-パントラクトン加水分解酵素産生能をもつ微生物、特に好ましくは上記フサリウム属をはじめとした微生物の、ゲノムDNA及びcDNAの単離及び検知のためのプローブとして有用である。遺伝子の単離にあたっては、PCR法、さらには逆転写酵素(RT)を用いたPCR法(RT-PCR)を利用することが出来る。

D-パントラクトン加水分解酵素及びその関連DNAは、クローニングされ、配列決定されたD-パントラクトン加水分解酵素 cDNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、DNAプライマーをデザインして化学合成し、得られたDNAプライマーを用いて、PCR法、RT-PCR、その他の方法を用いてD-パントラクトン加水分解酵素関連遺伝子の単離、検出などに利用することが出来る。

以上述べたように本発明に従えばD-パントラクトン加水分解酵素の遺伝子及び組換えDNA分子を宿主に移入し、D-パントラクトン加水分解酵素を発現させ、目的とするD-パントラクトン加水分解酵素を得る方法が提供される。こうして本発明によれば、D-パントラクトン加水分解酵素の遺伝子を実質的に発現する組換え体あるいはトランスフェ

クタント及びその製造法、さらにはその用途も提供される。

別の面では、本発明はD-パントラクトン加水分解酵素活性を有するタンパク質またはそれと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩、より好ましくはフサリウム・オキシスポルム由来のD-パントラクトン加水分解酵素またはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つ該タンパク質の少なくとも一部あるいは全部を有するポリペプチドを、大腸菌などの原核生物あるいは真核生物で発現させることを可能にするDNAやRNAなどの核酸に関するとすることができる。またこうした核酸、特にはDNAは、(a)配列表の配列番号：1で表されるアミノ酸配列をコードできる配列あるいはそれと相補的な配列、(b)該(a)のDNA配列またはその断片とハイブリダイズすることのできる配列、及び(c)該(a)又は(b)の配列にハイブリダイズすることのできる縮重コードを持った配列であることができる。こうした核酸で形質転換され、本発明の該ポリペプチドを発現できる大腸菌などの原核生物あるいは真核生物も本発明の特徴をなす。

本発明に従えば、D-パントラクトン加水分解酵素活性を有するタンパク質またはそれと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質をコードするDNA、あるいは該DNAを発現可能に含んでいるベクターなどのDNAを、D-パントラクトン加水分解酵素産生能をもつ微生物、例えば、フサリウム属、シリンドロカルポン属、ジベレラ属、アスペルジラス属、ペニシリウム属、リゾプス属、ボルテラ属、グリオクラディウム属、ユーロティウム属、ネクトリア属、シゾフィラム属、ミロセシウム属、ノイロスボラ属、アクリモニウム属、ツベルクリナ属、アブシジア属、スプロスリクス属、バーティシリウム属またはアルスロダーマ属に属する微生物に導入して、D-パントラクトン加水分解酵素

産生能を改変した微生物を得ることもできよう。こうした微生物としては、例えば、フサリウム・オキシスポルム IFO 5942、フサリウム・セミテクタム IFO 30200、シリンドロカルボン・トンキネンス IFO 30561、ジベレラ・フジクロイ IFO 5 6349、アスペルジラス・アワモリ IFO 4033、ペニシリウム クリソゲナム IFO 4626、リゾプス・オリザエ IFO 4706、ボルテラ・ブクシ IFO 6003、グリオクラディウム・カテヌラタム IFO 6121、ユーロティウム・シェバリエリ IFO 4334、ネクトリア・エレガンス IFO 7187、シゾフィラム・コムネ IFO 4928、ミロセシウム・ロリダム IFO 9531、ノイロスボラ・クラツサ IFO 6067、アクリモニウム・フシディオイデス IFO 6813、ツベルクリナ・ペルシシナ IFO 6464、アブシジア・リヒセイミ IFO 4009、15 スポロスリクス・シエンキ IFO 5983、バーティシリウム・マルトウセイ IFO 6624、またはアルスロダーマ・ウンシナトウム IFO 7865などが挙げられる。

形質転換の方法としては、適当な細胞壁溶解酵素を用いて調製したプロトプラスト化した細胞に、塩化カルシウム、ポリエチレンギリコールなどの存在下DNAを接触させるとか、エレクトロポレーション法（例えば、E. Neumann et al., "EMBO J", Vol. 1, pp. 841 (1982) など）、マイクロインジェクション法、遺伝子銃により打ち込む方法などが挙げられる。

25 酵素は、各種原料、例えば細胞培養液、細胞培養破碎物など、形質転換体細胞などの酵素産生材料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニ

ウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。また封入体として得られた場合には、可溶化処理、例えば、塩酸グアニジン、尿素といった変成剤、さらには必要に応じ、2-メルカプトエタノール、ジチオスルイツルなどの還元剤存在下に処理して活性型酵素とすることもできる。酵素としては酵素產生細胞をそのまま用いることが出来る。固定化酵素としては、当該分野で知られた方法で酵素又は酵素產生細胞などを固定化したものが挙げられ、共有結合法や吸着法といった担体結合法、架橋法、包括法などにより固定化できる。例えばグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネートなどの縮合剤を必要に応じて使用し、固定化できる。またモノマーを重合反応でゲル化させて行うモノマー法、通常のモノマーよりも大きな分子を重合させるプレポリマー法、ポリマーをゲル化させて行うポリマー法などが挙げられ、ポリアクリルアミドを用いた固定化、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン、寒天、 κ -カラギーナンなどの天然高分子を用いた固定化、光硬化性樹脂、ウレタンポリマーなどの合成高分子を用いた固定化などが挙げられる。微生物の培養、酵素を用いたD-パントラクトン加水分解をはじめとしたラクトン加水分解酵素利用の酵素的不斉加水分解によるラクトン系化合物の光学分割反応及び生成物の処理は特開平3-65198号および特開平4-144681号に記載のようにして行うことができる。

例えば、液体培地で振盪培養した形質転換菌を集菌し、得られた菌体にD、L-パントラクトン水溶液（2～60%濃度）を加え、pHを6～8に調整しながら温度10～40°Cで数時間から1日反応させる。反応終了後、菌体を分離し、反応液中の未反応L-パントラクトンを有機溶媒（酢酸エチルのようなエステル類、ベンゼンのような芳香族炭化水素類、クロロホルムのようなハロゲン化炭化水素等などが好ましい）を用いて抽出分離する。水層に残存しているD-パントイン酸を塩酸酸性下、加熱することによりラクトン化をおこない、上記した有機溶媒で抽出することにより生成したD-パントラクトンを得ることができる。このようにして、形質転換菌の処理菌体（乾燥菌体や固定化菌体等）や形質転換菌から得られた酵素や固定化酵素等も同様にしておこなうこと が可能である。

本発明の前述した種々の態様を利用することにより、D-パントラクトン加水分解をはじめとしたラクトン加水分解酵素利用の酵素的不斉加水分解によるラクトン系化合物の光学分割法に関する合成研究に有用な手段として、あるいはその他の用途に適用される種々の技術手段を提供することができる。以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されず、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。なお、明細書及び図面において、塩基及びアミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものであり、アミノ酸に光学異性体が存在する場合は、特に断らないかぎりL-体を示す。

後述の実施例1で得られたD-パントラクトン加水分解酵素の遺伝子を導入したベクター（PFLC40E）を保有する大腸菌JM109

(EJM-ESE-1) は、平成7年8月30日(原寄託日)から茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305)の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託されており(受託番号FERM P-15141)、平成8年8月28日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求がなされ、受託番号FERM BP-5638としてNIBHに保管されている。

実施例

以下に実施例を挙げ、本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されること無く様々な態様が含まれることは理解されるべきである。

実施例1

1) 精製酵素のアミノ酸配列決定

特開平4-144681号の実施例1に準じて調製した凍結乾燥D-パントラクトン加水分解酵素14.3 nmol(サブユニット分子量6万として)を15 8M尿素を含む50 mM Tris-HCl(pH9.0)44 μlに溶かし、37°Cで1時間変性させる。これに50 mM Tris-HCl(pH9.0)44 μlを添加して尿素濃度を4Mとする。12 nmol/mlのリジルエンドペプチダーゼ(和光純薬)12 μl(0.144 nmol, E/S=1/100)を添加し、30°Cで12時間消化をおこなう。得られた消化ペプチドを逆相カラム(ナカラ20 イテスク)で分取し、ABI社477Aプロテインシークエンサーでアミノ酸配列の分析をおこなった。

分取条件

カラム : Cosmosil 5C18-AR (4.6 x 250 mm)

流速 : 1 ml/min

温度 : 35 °C

5 検出波長 : 210 nm

溶離液 : A, 0.1% TFA (トリフルオロ酢酸)

B, 0.1% TFA/80% CH₃CN

溶出条件 : A → B のグラジエント溶出(15% /min)

アミノ酸配列の分析の結果は図1及び図2の通りであった。

10 2) ゲノムDNAの作製a) D-パントラクトン加水分解酵素のゲノムDNA抽出法

対数増殖期後期の菌体を減圧濾過で集菌した。液体窒素中に菌体を入れ、ワーリングブレンダーで細かく破碎した。ある程度細かくなつた菌体を乳鉢に移し液体窒素を加えながらすりつぶした。70 °Cに保温した

15 2 x CTAB液(2% CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide, シグマ),

0.1 M Tris-HCl, pH8.0, 1.4 M NaCl, 1% PVP (Polyvinylpyrrolidone, シグマ) に懸濁し、65 °Cで3~4時間インキュベートした。遠心分離した上清を順次、フェノール、フェノール/クロロホルム、クロロホルムで処理し、等容のイソプロパノールでDNAを沈殿させた。70%

20 エタノールで洗浄し、風乾後、TE (Tris 10 mM-EDTA

1 mM, pH 7.8) に溶解した。リボヌクレアーゼA およびリボヌクレアーゼT1でRNAを分解し、フェノール、フェノール/クロロホルム、クロロホルムで順次処理して除タンパク操作をおこなつた。等容のイソプロパノールでDNAを沈殿させた。70%エタノールで洗浄し、風乾

25 後、TEに溶解しゲノム標品を得た。

b) D-パントラクトン加水分解酵素遺伝子の增幅

D-パントラクトン加水分解酵素の内部ペプチドのアミノ酸配列の情報（図1及び図2）を基に、N-末端アミノ酸配列のセンスストランドに対応するセンスプライマーと内部ペプチド配列のアンチセンスストラ

5 ンドに対応するアンチセンスプライマーを各々合成した（図3）。

D-パントラクトン加水分解酵素のゲノムDNAを鋳型として下記の条件でPCRをおこなった。PCR增幅は、例えば R. Saiki, et al., Science, Vol. 230, pp. 1350 (1985); R. Saiki, et al., Science, Vol. 239, pp. 487 (1988); PCR Technology, Stockton Press (1989) などに記載された方法に従って行われた。PCR增幅により、約1kb 10 の增幅DNA断片を得た。

PCR条件

染色体DNA	2.5 μ g	
センスプライマー	250 pmol	(図3 参照)
15 アンチセンスプライマー	250 pmol	(図3 参照)
dNTP(2mM)	5 μ l	
Tth ポリメラーゼ緩衝液(x10)	5 μ l	-
Tth DNA ポリメラーゼ(東洋紡)	3 units	
H ₂ O		
20 合計	50 μ l	
	92°C/1分、55°C/1分、73°C/3分：30サイクル	

本得られた増幅DNA断片をシーケンスし、アミノ酸配列に変換したところ、D-パントラクトン加水分解酵素の内部ペプチドの部分アミノ酸配列の箇所が見いだされた。

3) c DNAの作製a) mRNAの作製

菌体は対数増殖期前期に集菌し、ただちに液体窒素で凍結後破碎し、
5 AGPC (Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform) 法 (例えば、
実験医学、Vol. 15, No. 15, p 99 (1991)) に従って全RNA
を抽出した。得られた全RNAをオリゴdT- セルロースカラム (ファル
マシア) にかけることにより精製した。

b) c DNAライブラリーの作製

得られたmRNA を鋳型として、cDNAラピッドアダプターライ
10 ゲーションモジュール (cDNA rapid adaptor ligation module,
cDNA synthesis module RPN 1256, 1994: アマシャム社 (Amersham
International plc)) を用いてcDNAを合成した。

c) D-ペントラクトン加水分解酵素cDNAのクローニング

宿主大腸菌にcDNAライブラリーを感染させ、プラークハイブリダ
15 イゼーションによりポジティブプラークを得た。ただし、ここで用いた
プローブはフサリウム・オキシスポルムのD-ペントラクトン加水分解
酵素遺伝子を含む約1kbの断片を鋳型とし、マルチプライム法で標識す
ることにより作製した。得られたクローンをシークエンスし、アミノ酸
配列に変換した結果、上記のD-ペントラクトン加水分解酵素遺伝子全
20 長のクローニングに成功したことが判明した。

こうして配列番号：2で表される塩基配列が得られた。この塩基配列
によりコードされる配列番号：1で表されるアミノ酸配列と相同性を示
す配列はN B R F (National Biomedical Research Foundation)

Protein Sequence Data Bank中には存在せず、この塩基配列を有するDNAは全く新規なものであることが認められた。

塩基配列を決定したcDNAには、N末端部分が一部欠けていて、開始コドンを有していないことが判明したので、開始コドンを新たに人工的に挿入した発現ベクター (PFLC40E と命名) の構築をPCR法によりおこなった。

図4で示される制限酵素サイトを有するセンスおよびアンチセンスプライマーの合成オリゴヌクレオチドを作製し、これらのプライマーを用い、以下の条件でPCR反応をおこなった。PCR増幅は、例えば R. Saiki, et al., Science, Vol. 230, pp. 1350 (1985); R. Saiki, et al., Science, Vol. 239, pp. 487 (1988); PCR Technology, Stockton Press (1989)などに記載された方法に従って行われた。

PCR条件

	Total DNA (cDNA)	1 0	μ g
15	センスプライマー	0. 1	nmol (図4参照)
	アンチセンスプライマー	0. 1	nmol (図4参照)
	dNTP (2 mM)	1 0	μ l
	Tth ポリメラーゼ緩衝液(x10)	1 0	μ l
20	Tth DNA ポリメラーゼ	4	units
	H ₂ O		
	合計	1 0 0	μ l
	9 4 °C / 1 分、 5 5 °C / 1 分、 7 5 °C / 3 分 : 3 0 サイクル		

こうして得られたPCR産物は両端にそれぞれEcoRI とXbaIの制限酵素サイトをもつので、各制限酵素 (EcoRI (宝酒造) とXbaI (宝酒造))

処理をおこない、pUC18 とライゲーション反応を行う（宝ライゲーションキット）ことにより発現ベクター（PFLC40E）を構築した。

次に当該ベクターを “Molecular Cloning” second ed., 1989, ed. by J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press に記載された方法に従い、E. coli JM 109 のコンピテントセルにトランスフォーメーションし、形質転換をおこなった。なお、当該形質転換体は50mg/lのアンピシリンを含む 2 x YT 培地（トリプトン1.5%、酵母エキス1%、NaCl 0.5%）上で選択した。形質転換処理は、塩化カルシウム法に従った。

こうして得られた組換え大腸菌を上記した50mg/lのアンピシリン含有 2 x YT 培地10mlを含む試験管で前培養をおこない、この前培養液（計 100 μ l）を種菌として前培養液と同じ組成からなる本培養液 100 ml で培養時間、培養温度、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド（IPTG）添加時間等を検討した。培養結果を表1に示す。培養後、得られた菌体を超音波破碎し、遠心上清を用いてD-パントラクトン加水分解酵素活性を測定した。最適条件での比活性は2.25 U/mg であった。D-パントラクトン加水分解酵素の酵素活性の測定は次の条件で行い、1分間に 1 μ mol のD-パントラクトンを加水分解する酵素活性を1単位（unit）とする。D-パントラクトン 10 %濃度の 0.5 M PIPES 緩衝溶液（pH 7.0）200 μ lに酵素溶液 50 μ lを加え、30°Cで120分間反応させた後 2 mM EDTA のメタノール溶液 250 μ lを加え反応を停止させる。反応終了液を HPLC (Nucleosil 5C₁₈ 4.6×150mm、溶離液 10 %メタノール、流速 1 ml/min、検出波長230nm) を用いて加水分解率を求める。酵素活性は例えば加水分解率が 1 %であれば、酵素溶液 1 ml 当たりの活性は

1. 6×10^{-2} U/m l となる。

PFLC 40E で形質転換された大腸菌 JM109 は $2 \times$ YT 培地中で培養した。IPTG は、最終濃度 2 mM となるように加えた。

表 1

IPTG 供給時間 (h r)	培養時間 (h r)	培養温度 (°C)	比活性 (units/mg)
0 ^a	6	28	0.86
0 ^a	12	28	1.94
4 ^b	7	28	1.33
4 ^b	12	28	2.25
0 ^a	6	37	1.05
0 ^a	12	37	1.73
4 ^b	7	37	1.31
4 ^b	12	37	1.67

a : IPTG は、培養開始と同時に $2 \times$ YT 培地中に加えた。

b : IPTG は、培養開始後 4 時間して $2 \times$ YT 培地中に加えた。

SDS-PAGE をおこなった結果、遠心沈殿部の不溶性画分に予想分子量の太いバンドが検出されたのでこのバンドについてプロッティングをおこない、エドマン分解法により N 末端のアミノ酸配列を調べた結果、D-バントラクトン加水分解酵素のそれと一致した。従って D-バントラクトン加水分解酵素 cDNA の本大腸菌発現系において D-バントラクト

ン加水分解酵素の一部は可溶性で発現しているものの、大部分は inclusion body (封入体) として発現しているものと考えられる。上記D-パントラクトン加水分解酵素の遺伝子を導入したベクター (PFLC40E) を保有する大腸菌JM109 (EJM-ESE-1) は、茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305) の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に受託番号 FERM BP-5638 として寄託保存されている [平成7年8月30日 (原寄託日) に寄託された受託番号 FERM P-15141 (微研菌寄第P-15141号; 原寄託) よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求が平成8年8月28日になされた]。

産業上の利用可能性

天然のD-パントラクトン加水分解酵素、例えば、フサリウム・オキシスポルム (Fusarium oxysporum) 由来の天然のD-パントラクトン加水分解酵素またはそれと実質的に同等な活性を有するタンパク質をコードする遺伝子構造が明らかにされ、該タンパク質をコードする塩基配列を含有するDNAで形質転換せしめた宿主細胞、該宿主細胞を用いる該タンパク質の製造方法、さらにはそれらタンパク質および宿主細胞を用いてのD-パントラクトンの製造などの用途において飛躍的な発展を期待でき、さらにD-パントラクトン加水分解酵素そのものの改変により酵素活性の飛躍的な上昇を可能ならしめることが可能である。

配 列 表

【配列番号：1】

配列の長さ：380

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala	Lys	Leu	Pro	Ser	Thr	Ala	Gln	Ile	Ile	Asp	Gln	Lys	Ser	Phe	Asn
1															15
Val	Leu	Lys	Asp	Val	Pro	Pro	Pro	Ala	Val	Ala	Asn	Asp	Ser	Leu	Val
															20 25 30
Phe	Thr	Trp	Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Lys	Pro	Phe
															35 40 45
His	Val	Tyr	Asp	Glu	Glu	Phe	Tyr	Asp	Val	Ile	Gly	Lys	Asp	Pro	Ser
															50 55 60
Leu	Thr	Leu	Ile	Ala	Thr	Ser	Asp	Thr	Asp	Pro	Ile	Phe	His	Glu	Ala
															65 70 75 80
Val	Val	Trp	Tyr	Pro	Pro	Thr	Glu	Glu	Val	Phe	Phe	Val	Gln	Asn	Ala
															85 90 95
Gly	Ala	Pro	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Leu	Asn	Lys	Ser	Ser	Ile	Ile	Gln
															100 105 110
Lys	Ile	Ser	Leu	Lys	Glu	Ala	Asp	Ala	Val	Arg	Lys	Gly	Gln	Asp	
															115 120 125
Glu	Val	Lys	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ser	Asn	Pro	Gln	Val	Ile	Asn	Pro
															130 135 140
Asn	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Asn	Ile	Ile	Phe	Ala	Gly	Glu	Gly
															145 150 155 160

Gln Gly Asp Asp Val Pro Ser Ala Leu Tyr Leu Met Asn Pro Leu Pro
165 170 175
Pro Tyr Asn Thr Thr Leu Leu Asn Asn Tyr Phe Gly Arg Gln Phe
180 185 190
Asn Ser Leu Asn Asp Val Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Asp Leu Tyr
195 200 205
Phe Thr Asp Thr Leu Tyr Gly Tyr Leu Gln Asp Phe Arg Pro Val Pro
210 215 120
Gly Leu Arg Asn Gln Val Tyr Arg Tyr Asn Phe Asp Thr Gly Ala Val
225 230 235 240
Thr Val Val Ala Asp Asp Phe Thr Leu Pro Asn Gly Ile Gly Phe Gly
245 250 255
Pro Asp Gly Lys Lys Val Tyr Val Thr Asp Thr Gly Ile Ala Leu Gly
260 265 270
Phe Tyr Gly Arg Asn Leu Ser Ser Pro Ala Ser Val Tyr Ser Phe Asp
275 280 285
Val Asn Gln Asp Gly Thr Leu Gln Asn Arg Lys Thr Phe Ala Tyr Val
290 295 300
Ala Ser Phe Ile Pro Asp Gly Val His Thr Asp Ser Lys Gly Arg Val
305 310 315 320
Tyr Ala Gly Cys Gly Asp Gly Val His Val Trp Asn Pro Ser Gly Lys
325 330 335
Leu Ile Gly Lys Ile Tyr Thr Gly Thr Val Ala Ala Asn Phe Gln Phe
340 345 350
Ala Gly Lys Gly Arg Met Ile Ile Thr Gly Gln Thr Lys Leu Phe Tyr
355 360 365
Val Thr Leu Gly Ala Ser Gly Pro Lys Leu Tyr Asp
370 375 380

【配列番号：2】

配列の長さ：1140

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：フサリウム・オキシスボルム I F O 5 9 4 2

配列

GCTAAGCTTCCTTCTACGGCTCAGATTATTGATCAGAAGTCGTTCAATGTCTGAAGGAT	60
GTGCCACCTCCTGCAGTGGCCAAATGACTCTCTGGTGTTCACTTGGCCTGGTGTAACTGAG	120
GAGTCTCTTGTGAGAACGCTTCCATGTCTACGATGAAGAGTTACGATGTAATTGGA	180
AAAGACCCCTTTGACCCCTCATCGAACATCGGACACCGACCCAATCTTCATGAGGCT	240
GTCGTATGGTATCCTCCTACTGAAGAGGTGTTCTTGCGAGAATGCTGGCCTCCTGCC	300
GCAGGCACTGGCTTGAACAAGTCTTCATCATTCAAAGATTCCCTCAAGGGAGGCCAT	360
GCTGTTGCAAGGGCAAGCAGGATGAGGTCAAGGTACAGTTGTTGACTCGAACCCCTCAG	420
GTTATCAACCCAAATGGTGGTACTTACTACAAGGGCAACATCATCTTCGCTGGTGAGGGC	480
CAAGGCGACGATGTTCCCTCTGCGCTGTACCTCATGAACCCCTCTCCCTCCTACAACACC	540
ACCACCCCTCTAACAACTACTTCGGTCGCCAGTTCAACTCCCTAACGACGTCGGTATC	600
AACCCCAGGAACGGTGACCTGTACTTCACCGATAACCCCTACGGATATCTCAAGACTTC	660
CGTCCTGTTCTGGTCTGCGAAACCAAGGTCTATCGTTACAACTTGACACTGGCCTGTC	720
ACTGTTGCGCTGATGACTTTACCCCTCCAAACGGTATTGGCTTGGCCCCGACGGCAAG	780
AAGGTTTATGTCACCGACACTGGCATCGCTCTGGTTCTACGGTCGCAACCTCTTTCT	840
CCCGCTTCTGTTACTCTTCGACGTGAACCAAGGACGGTACTCTTCAGAACCGCAAGACC	900
TTTGCTTATGTTGCCCTCATTCATCCCCGATGGTGTCCACACTGACTCCAAGGGCGTGT	960
TATGCTGGCTGCCGTGATGGTGTCCATGTCTGGAACCCCTCTGGCAAGCTCATGGCAAG	1020
ATCTACACCGAACGGTTGCTGCTAACTTCCAGTTGCTGGTAAGGGAAGGATGATAATT	1080
ACTGGACAGACGAAGTTGTTATGTCACTCTAGGGCTCGGGTCCCAAGCTCTATGAT	1140

請 求 の 範 囲

1. 天然のD-パントラクトン加水分解酵素またはそれと実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次コンフォメーションを持つものであることを特徴とするタンパク質またはその塩。
- 5 2. 該天然のD-パントラクトン加水分解酵素がフサリウム属、シリンドロカルポン属、ジベレラ属、アスペルジラス属、ペニシリウム属、リゾプス属、ボルテラ属、グリオクラディウム属、ユーロティウム属、ネクトリア属、シゾフィラム属、ミロセシウム属、ノイロスボラ属、アクリモニウム属、ツベルクリナ属、アブシジア属、スポロスリクス属、バーティシリウム属またはアルスロダーマ属に属する微生物由来のものであることを特徴とする請求項1記載のタンパク質。
- 10 3. 該天然のD-パントラクトン加水分解酵素がフサリウム属由来のものであることを特徴とする請求項1記載のタンパク質。
4. 配列表の配列番号：1で表されるアミノ酸配列またはそれと実質的に同等のアミノ酸配列を有するD-パントラクトン加水分解酵素またはその塩であることを特徴とする請求項1～3のいずれか一記載のタンパク質。
- 15 5. 外因性DNA配列を原核生物において発現して得たものであることを特徴とする請求項1～4のいずれか一記載のタンパク質。
6. 配列表の配列番号：1で表されるアミノ酸配列またはそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1～5のいずれか一記載のタンパク質。
- 20 7. 請求項1～6のいずれか一記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

8. 請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とする核酸。
9. 配列表の配列番号 : 2 で表される塩基配列のうちオープンリーディングフレーム部分またはそれと実質的に同等な活性を有する塩基配列を有することを特徴とする請求項 8 記載の核酸。
10. 請求項 8 又は 9 記載の核酸を含有することを特徴とするベクター。
11. 請求項 10 記載のベクターを保有することを特徴とする形質転換体。
12. 請求項 11 記載の形質転換体を増殖可能な栄養培地で培養し、組換えタンパク質として D-バントラクトン加水分解酵素またはその塩を包含する請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする D-バントラクトン加水分解酵素またはその塩を包含する請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載のタンパク質又はその部分ペプチドの製造方法。
13. 請求項 1 ~ 7 のいずれか一記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたは請求項 11 記載の形質転換体を用いての D、L-バントラクトンの光学分割による D-バントラクトンの製造法。

ペプチド番号 アミノ酸配列

N-terminal A K L P S T A Q I I D Q K S F N V L K D V P P P A V A ★ D S

No.1	Q D E V K
No.2	E A D A V R K
No.3	L I G K
No.4	L Y D
No.5	S S I I Q K
No.6	I S L K
No.7	G R M I X T G Q T K
No.8	L P S T A Q I I D Q K
No.9	S F N V L K
No.10	V T V V D S N P Q V I N P N G G T Y Y K
No.11	G R V Y A G X G D G V H V W N P S G K
No.12	I Y T G T V A A N F Q F A G K
No.13	L F Y V T L G A S G P K
No.14	T F A Y V A S F I P D G V H T D S K
No.15	P F H V Y D E E F Y D V I G K
No.16	V Y V T D T G I A L G F Y G R ★ L S S P A S V Y S F D V N Q D G T L Q N R K
No.17	D V P P P A V A ★ D S L V F T (W) P G V T E E S L V E K
No.18	D P S L T L I A T S D T D P I F H E A V V W Y P P T E (E) V F F V Q N A G A P A A G T G L ★ K
No.19	G N I I F A G E G Q G D D V P P S A L Y L M N P L P (P) Y ★ T T T L X - - -

★：糖鎖の付加したN残基 X：不定残基

図 1

2 / 5

10	20	30	40	50
<u>A K L P S T A Q I I D Q K S F N V L K D V P P P A V A N D S L V F T W P G V T E E S S L V E K P F H V</u>				
No.8	No.9	No.17		No.15
60	70	80	90	100
<u>Y D E E F Y D V I G K D P S S L T L I A T S D T D P I F H E A V V W Y P P T E E V F F V Q N A G A P A</u>				
No.18				
110	120	130	140	150
<u>A G T G L N K S S I I Q K I S S L K E A D A V R K G K Q D E V K V T V V D S N P Q V I N P N G G T Y Y</u>				
No.5	No.6	No.2	No.1	No.10
160	170	180	190	200
<u>K G N I I F A G E G Q G D D V P S A L Y L M N P L P P Y N T T T L L N N Y F G R Q F N S L N D V G I</u>				
No.19				
210	220	230	240	250
<u>N P R N G D L Y F T D T L Y G Y L Q D F R P V P G L R N Q V Y R Y N F D T G A V T V V A D D F T L P</u>				
260	270	280	290	300
<u>N G I G F G P D G K K V Y V T D T G I A L G F Y G R N L S S P A S V Y S F D V N Q D G T L Q N R K T</u>				
No.16				
310	320	330	340	350
<u>F A Y V A S F I P D G V H T D S K G R V Y A G C G D G V H V W N P S G K L I G K I Y T G T V A A N F</u>				
No.14	No.11	No.3	No.12	
360	370	380		
<u>Q F A G K G R M I I T G Q T K L F Y V T L G A S S G P K L Y D</u>	No.7	No.13	No.4	

2

3 / 5

Sense primer (N-terminal sequence)

5' AAAAGC TTC CAC GTC TAC GAC GAA GAA TTC TAC GAC GT 3'
HindIII T T G G T T T

Antisense primer (Internal sequence)

5' GGCTTGCTGCA GGG GTT CCA AAC GTG AAC ACC GTC 3'
Pst I A C A C C A
G G G T T T

☒ 3

4 / 5

FL-E1 (Sense primer)

5' GTGAAATTCTAAGGAAATAGGTGATGGCTAAGCTTCTACGGCTCAG 3'
SD
EcoRI Stop Start

FL-E2 (Antisense primer)

5' GTAAGTCTAGAGAAGTGAACATTCTAAATCATAGAG 3'
XbaI

☒ 4

10 20 30 40 50 60
 CCATGGTGGCTGCTAAAGCTTCTTCTACGGCTCAGATTATTGATCAGAAGTCGGTCAATG
 A K L P S T A Q I I D Q K S F N V
 70 80 90 100 110 120
 TCTTGAAGCATGTGCCACCTCTGCAGTGGCCAATGACTCTCTGGTGTTCACTTGGCCTG
 L K D V P P A V A N D S L V F T W P G
 130 140 150 160 170 180
 GTGTAACCTGAGGACTCTTGTGAGAACGCTTCCATGCTACGATGAAGAGACTTTACG
 V T E E S L V E K P F H V Y D E E F Y D
 190 200 210 220 230 240
 ATGTAATTGAAAGACCCCTCTTGACCCCTCATCGAACATCGGACACCGACCCAATCT
 V I G K D P S L T L I A T S D T D P I F
 250 260 270 280 290 300
 TCCATGAGGCTGCTGATGGTATCCTCTACTGAAGAGGTGTTCTTGTGCAGAATGCTG
 H E A V V W Y P P T E E V F F V Q N A G
 310 320 330 340 350 360
 GCGCTCCTGCCAGGGCACTGGCTTGAACAAGTCTTCCATCATTCAAGAAGATTCCCTCA
 A P A A G T G L N K S S I I Q K I S L K
 370 380 390 400 410 420
 AGGAGGCCATGCTGCTGGCAAGGGCAACAGGATGAGGTCAAGGTCAAGCTTGTGACT
 E A D A V R K G K Q D E V K V T V V D S
 430 440 450 460 470 480
 CGAACCCCTCAGGTTATCAACCCAAATGGTGGTACTTACTACAAGGGCAACATCATCTCG
 N P Q V I N P N G G T Y Y K G N I I F A
 490 500 510 520 530 540
 CTGGTGGGGCCAAGGGGACGGATGTTCCCTCTGGGCTGTACCTCATGAACCCCTCCCTC
 G E G Q G D D V P S A L Y L M N P L P P
 550 560 570 580 590 600
 CTTACAAACACCACCCCTCTCAACAACTACTTCGGTCGGCAAGTTCAACTCCCTCAACG
 Y N T T L L N N Y F G R Q F N S L N D
 610 620 630 640 650 660
 ACCTCGGTATCAACCCCAAGGAACGGTGACCTGTACTTCACCGATAACCCCTACGGATATC
 V G I N P R N G D L Y F T D T L Y G Y L
 670 680 690 700 710 720
 TCCAAGACTTCCGTCTTCCCTGGCTGGAAACCAAGGTATCGTTACAACCTTGACA
 Q D F R P V P G L R N Q V Y R Y N F D T
 730 740 750 760 770 780
 CTGGCGCTGTCACTGTTGTCGCTGATGACTTACCCCTCCCAACGGTATTGGCTTGGCC
 G A V T V V A D D F T L P N G I G F G P
 790 800 810 820 830 840
 CCGACGGCAAGAGGTTATGTCACCGACACTGGCATGGCTCTGGTTTACGGTCGCA
 D G K K V Y V T D T G I A L G F Y G R N
 850 860 870 880 890 900
 ACTCTCTTCTCCGCTCTGTTACTCTTCGACGTCAACCAAGGACGGTACTCTTCAGA
 L S S P A S V Y S F D V N Q D G T L Q N
 910 920 930 940 950 960
 ACCGCAAGACCTTGCTTATGTTGCTCATTCATCCCCGATGGTGTCCACACTGACTCCA
 R K T F A Y V A S F I P D G V H T D S K
 970 980 990 1000 1010 1020
 AGGGCTCGTCTTATGCTGGCTGGCTGCGGTGATGGTGTCCATGTCGGAAACCCCTCTGGCAAGC
 G R V Y A G C G D G V H V W N P S G K L
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TCATGGCAAGATCTACACCGGAACGGTGCTGCTAACTTCAGTTGCTGGTAAGGGAA
 I G K I Y T G T V A A N F Q F A G K G R
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GGATGATAATTACTGGACAGACCAAGTTGTTCTATGTCACTCTAGGGCTTGGCTCCCA
 M I I T G Q T K L F Y V T L G A S G P K
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGCTCTATGATTAGAAATGTTCACTCTCTATACTACATAGATAATACATGGCATTG
 L Y D *
 1210 1220 1230
 CTTTGAAAAAAACCATGG

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. C1⁶ C12N15/55, C12N15/63, C12P17/04, C12N9/18, C12N1/21, C07D307/04 // (C12N15/55, C12R1:77) (C12N15/63, C12R1:77) (C12N9/18, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/55, C12N15/63, C12P17/04, C12N9/18, C12N1/21, C07D307/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GENETYX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP, 4-144681, A (Fuji Chemical Industries, Ltd.), May 19, 1992 (19. 05. 92) & WO, 92/06182, A & EP, 504421, A1 & US, 5372940, A	1-7, 13 8 - 12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search December 5, 1996 (05. 12. 96)	Date of mailing of the international search report December 17, 1996 (17. 12. 96)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/55, C12N15/63, C12P17/04, C12N9/18, C12N1/21, C07D307/04//
(C12N15/55, C12R1:77) (C12N15/63, C12R1:77) (C12N9/18, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/55, C12N15/63, C12P17/04, C12N9/18, C12N1/21, C07D307/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GENETYX

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 4-144681, A (富士薬品工業株式会社) 19.5月.1992 (19.95.92) &	1-7, 13
A	WO, 92-06182, A&EP, 504421, A1&US, 5372940, A	8-12

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.12.96

国際調査報告の発送日

17.12.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上騎見高 印

4B18827

電話番号 03-3581-1101 内線 3448